

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	小松田 浩樹
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Mitogen-activated protein kinase inhibition augments the T cell response against HOXB7-expressing tumor through human leukocyte antigen upregulation (MAPK阻害はHOXB7発現腫瘍のHLAの上昇を介してT細胞応答を増強する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>脇坂理紗、河野通久、熊井琢美、林隆介、山木英聖、佐藤遼介、長門利純、大栗敬幸、小坂朱、大原賢三、高原幹、片田彰博、小林博也</p> <p>掲載雑誌</p> <p>Cancer Science. 2023;114(2):399-409.</p> <p>研 究 目 的</p> <p>頭頸部癌は世界で6番目に多い癌腫で、世界中で年間60万人の新規症例が報告されている。手術・化学療法・放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われているが、5年生存率は50%未満であり、65%以上の患者が再発・転移を来す。近年、免疫チェックポイント阻害薬が臨床応用され免疫療法に注目が集まっているが、頭頸部癌における奏効率は20%未満と低く、新規免疫療法の開発が急務である（引用文献1）。</p> <p>ホメオボックスB7 (HOXB7) は胚細胞の発達と分化を調節するホメオドメインタンパク質をコードする遺伝子であり、異常発現が乳癌や膵臓癌等で報告されている。HOXB7の異常発現は腫瘍進行や予後不良との関連が報告されているが、その阻害剤は開発されていない。</p> <p>本研究では、頭頸部扁平上皮癌におけるHOXB7の発現を確認し、新規に同定したHOXB7エピトープペプチドを用いてHOXB7反応性ヘルパーT細胞 (HTL) を誘導しその抗腫瘍効果を検討した。さらに、HOXB7の下流にあるシグナルを検索しMAPK阻害とペプチドワクチン療法の併用効果について検討した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 頭頸部扁平上皮癌細胞株および患者組織におけるHOXB7発現の検討

ウエスタンブロットを用いて頭頸部扁平上皮癌細胞株におけるHOXB7の発現を確認した。2007年から2020年に旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で治療を行った中咽頭癌患者66例の生検・手術材料を用いて、HOXB7の発現を免疫組織科学染色によって評価し、臨床的特徴との関係を検討した。

2. 健常人末梢血を用いたHOXB7反応性CD4陽性ヘルパーT細胞の誘導

HOXB7の全アミノ酸配列から、複数のHLAクラスII分子への結合能が高い配列をコンピューターアルゴリズムにより同定しペプチドを精製した。健常人末梢血からHTLを分離し、エピトープペプチドと抗原提示細胞により複数回刺激する事でペプチド特異的なHTLを樹立した。ペプチドおよび抗原提示細胞と共培養した際の上清中に放出されたIFN- γ を測定し特異性を確認した。さらに単一のヒトHLA-DRを発現するマウス線維芽細胞(L-cell)と共培養する事でHLA-DR拘束性を確認した。

3. HOXB7陽性頭頸部扁平上皮癌細胞株に対するHOXB7反応性CD4陽性ヘルパーT細胞の反応性の検討

HOXB7反応性HTLとHOXB7陽性頭頸部扁平上皮癌細胞株を共培養し、上清中のIFN- γ とGranzymeBを測定する事で反応性・細胞障害活性を評価した。共培養前の腫瘍細胞をCFSEでラベルし、共培養後に死細胞を7-AADで染色し障害活性を測定した。

4. 頭頸部扁平上皮癌患者末梢血中におけるHOXB7ペプチド反応性T細胞の検出

頭頸部扁平上皮癌患者末梢血から単核球を分離し、HOXB7ペプチドで刺激する事でHOXB7反応性T細胞の存在を確認した。

5. HOXB7反応性HTLとMEK阻害剤の併用効果の検討

HOXB7反応性HTLとHOXB7陽性頭頸部扁平上皮癌細胞株との共培養系において、細胞株をMEK阻害剤で前処理する事による反応性の違いを評価した。

生検・手術材料の免疫組織科学染色および癌患者末梢血中のHOXB7反応性T細胞の検出は旭川医科大学倫理委員会の承認を得て行った（承認番号16217および20001）。

成 績

1. 細胞株および癌患者組織中のHOXB7の発現

ウエスタンブロットで確認した全ての頭頸部扁平上皮癌細胞株でHOXB7の発現を確認した。中咽頭癌患者66例の手術・生検検体で免疫組織科学染色を施行し、76% (50/66例) でHOXB7が陽性であった。HOXB7高発現患者では有意にリンパ節転移陽性例が多かった。多くの症例でHOXB7陽性である事から免疫療法の標的抗原として適している可能性が示唆された。

2. HOXB7反応性HTLの誘導

複数のHLAクラスII分子に結合しやすい配列としてHOXB7₈₋₂₅を同定し精製した。このペプチドを用いて健常人末梢血から分離したHTLを複数回刺激し、HOXB7反応性HTLクローンを樹立した。これらのHTLクローンはペプチドとの共培養で濃度依存性にIFN- γ を産生し、L-cellとの共培養からHLA-DR拘束性である事を確認した。

3. HOXB7反応性CHTLの癌細胞株への反応

樹立したHOXB7反応性HTLは、HOXB7陽性頭頸部扁平上皮癌細胞株と共培養する事で腫瘍に発現したHOXB7を特異的に認識しIFN- γ およびGranzymeBを産生した。共培養後の死細胞を7-AADで染色しフローサイトメトリーで解析したところ、このHTLは癌細胞株を直接殺傷する能力を有していた。以上からHOXB7₈₋₂₅ペプチドは腫瘍反応性HTLを誘導できるエピトープである事が確認できた。

4. 頭頸部扁平上皮癌患者末梢血中におけるHOXB7ペプチド反応性T細胞の検出

頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血単核球をHOXB7₈₋₂₅ペプチドで刺激したところ、癌患者5例全例でIFN- γ の産生を認めた。頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血中に、HOXB7₈₋₂₅ペプチド反応性T細胞が存在している事が示された。

5. HOXB7反応性HTLとMEK阻害剤の併用

頭頸部扁平上皮癌細胞株において、HOXB7のノックダウンによりリン酸化MEKの発現が低下した。頭頸部扁平上皮癌細胞株をMEK阻害剤で処理すると、HLAクラスIIの発現が上昇する事を発見した。この事から、HOXB7陽性細胞株をMEK阻害剤で処理した後にHOXB7反応性HTLと共培養すると、IFN- γ の産生が上昇する事を確認した。MEK阻害剤はHOXB7を標的としたペプチドワクチン療法において有効なアジュバントとなり得る可能性が示唆された。

考 案

今回我々は、抗腫瘍活性を持つHTLが誘導可能な新規のHOXB7エピトープを同定した。現状では抗腫瘍ワクチンに関する報告はキラーT細胞(CTL)に焦点を当てているものが大多数である。我々の用いたHTLの利点は、共刺激分子を抗原提示細胞に供給しCTLの抗腫瘍効果を補助すると共に、自身も直接抗腫瘍効果を有している点である。(参考論文1)

本研究では腫瘍関連抗原としてHOXB7を選択した。HOXB7の過剰発現と予後不良は複数の癌腫で報告されており、特に大腸がんにおいては予後予測のバイオマーカーとして有効である可能性が報告されている。(引用文献2) また、HOXB7はMAPK経路を介して腫瘍のMHC発現を抑制する事で免疫逃避機構の一部を担っている可能性を発見した。腫瘍に有利な微小環境では、IFN- γ などMHC発現を上昇させるのに必要なサイトカインが不十分である可能性があり、本研究で使用したMEK阻害剤はペプチドワクチンなど腫瘍特異的な免疫応答を誘導するための有望な免疫アジュバントである可能性が示唆された。

結 論

HOXB7は頭頸部扁平上皮癌において高率に発現している事を発見した。抗腫瘍活性を持つ抗原特異的なHTLの誘導が可能な新規のHOXB7エピトープを同定した。さらにHOXB7反応性T細胞が癌患者末梢血中に存在している事を発見した。また、MEK阻害剤は腫瘍細胞上のMHCクラスIIの発現上昇を介してHTLの抗腫瘍活性を増強させた。

以上から、HOXB7は抗原特異的免疫療法における有効な標的抗原となり得る事および、ペプチドワクチン療法とMEK阻害剤の併用療法が癌治療において有効な戦略となり得る可能性が示唆された。

引 用 文 献

- 1.Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1856-67.
- 2.Liao WT, Jiang D, Yuan J, Cui YM, Shi XW, Chen CM, et al. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3569-78.

参 考 論 文

- 1.Kono M, Komatsuda H, Yamaki H, Kumai T, Hayashi R, Wakisaka R, et al. Immunomodulation via FGFR inhibition augments FGFR1 targeting T-cell based antitumor immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2022;11(1):2021619.